



UNIVERSIDADE FEDERAL DO NORTE DO TOCANTINS
CAMPUS DE ARAUGUAÍNA
CURSO DE ZOOTECNIA

CAROLINA MERLIN MEURER

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Escherichia coli* DIARREIOGÊNICA
DURANTE A *SHELF LIFE* E MATURAÇÃO A VÁCUO DE *Longissimus lumborum***

ARAGUAÍNA (TO)

2022

CAROLINA MERLIN MEURER

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Escherichia coli* DIARREIOGÊNICA
DURANTE A *SHELF LIFE* E MATURAÇÃO A VÁCUO DE *Longissimus lumborum*

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à UFNT – Universidade
Federal do Norte do Tocantins – Campus
Universitário de Araguaína para obtenção
do Título de Bacharel em Zootecnia.

Orientador: Dr. José Carlos Ribeiro Júnior

ARAGUAÍNA (TO)

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

M598c Meurer, Carolina.

Caracterização molecular de *Escherichia coli* diarreio gênica durante a shelf life e maturação a vácuo de *Longissimus lumborum*. / Carolina Meurer. – Araguaína, TO, 2022.

36 f.

Monografia Graduação - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Araguaína - Curso de Zootecnia, 2022.

Orientador: José Carlos Ribeiro Júnior

1. Biologia Molecular. 2. Contrafilé. 3. Enterobactéria. 4. Reação em Cadeia da Polimerase Multiplex. I. Título

CDD 636

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

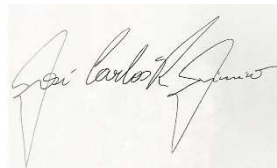
CAROLINA MERLIN MEURER

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Escherichia coli* DIARREIOGÊNICA
DURANTE A *SHELF LIFE* E MATURAÇÃO A VÁCUO DE *Longissimus lumborum*

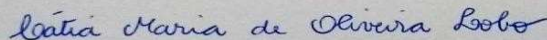
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à UFNT – Universidade Federal do Norte do Tocantins – Campus Universitário de Araguaína, Curso de Zootecnia, foi avaliado para a obtenção do Título de Bacharel em Zootecnia e aprovado em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Data de Aprovação: 04 de Julho de 2022.

Banca examinadora:



Prof. Dr. José Carlos Ribeiro Júnior Orientador, UFNT.



Profa. Dra. Cátia Maria de Oliveira Lobo, UFNT.

Documento assinado digitalmente
gov.br JEYCY KELLE SIRQUEIRA MENDONÇA
Data: 17/07/2022 18:09:30-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

M.V. Jeycy Kelle Sirqueira Mendonça, ADAPEC

Dedico este trabalho a Daniela, Cristiano, Mateus e Luiza, pelo incentivo, força, confiança, amor e porto seguro que sempre me proporcionaram.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus e Nossa Senhora, por sempre estarem me acompanhando, guiando e iluminando, durante todos os meus passos na trajetória da vida. Aos amores da minha vida, minha mãe Daniela de Fátima Merlin Meurer, meu pai Cristiano José Meurer, meu irmão Mateus e minha irmã Luiza por serem minha base e fortaleza durante as diversas etapas da vida, sem vocês eu não seria eu.

Agradeço ao meu orientador, professor José Carlos Ribeiro Júnior, pela orientação, apoio, confiança, dedicação, ensinamentos e incentivo ao longo desse trabalho, é uma honra aprender com o senhor. A toda a equipe do Laboratório de Microbiologia de Alimentos por estar presente em todas as etapas do trabalho, não somente como colegas, mas como família, contribuindo para meu crescimento profissional e pessoal.

Gostaria de agradecer em especial minha avó Josi, meu avô Daniel e ao Eduardo, que estando longe ou perto, sempre me apoiaram e motivaram em todos os momentos.

Aos meus amigos, Ana Carolina, Thayná, Loyse, Thays, Kaynan, Almerinda e Jorge que estão sempre presentes nos desafios da minha vida, vocês estão no meu coração, obrigada pela amizade e companheirismo durante essa jornada.

Aos meus professores, muito obrigada por colaborarem em minha formação como profissional.

Enfim, a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram na elaboração deste trabalho e me ajudaram a enfrentar todos os obstáculos, muito obrigada por tudo.

RESUMO

Na última década o Brasil assegura seu posto como segundo maior produtor de carne bovina no mercado mundial. Acrescenta-se que, segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, foi projetado que nos próximos dez anos o consumo de carne bovina aumentará em 10,4%. Para acompanhar o crescimento de produção, também é imprescindível o aumento da sua qualidade física, química e microbiológica. A enterobactéria *Escherichia coli* é sugestiva de indicação de contaminação de origem fecal, na qualidade de carne indicadora de processamento inadequado durante o abate. Para a saúde pública tem importância por algumas estirpes estarem associadas a casos de diarreia em estudos epidemiológicos. O objetivo do presente trabalho foi determinar a contagem e a caracterização molecular de *E. coli* diarreiogênica durante a vida útil de contrafilé bovino (*Longissimus lumborum*) embalado a vácuo. Peças de cinco cortes foram obtidas em um frigorífico de inspeção federal e analisadas nos dias 0, 20, 40 e 60 após a embalagem a vácuo. A contagem e identificação de *E. coli* foram realizadas utilizando metodologias oficiais. Os isolados foram submetidos a ensaios de PCR *multiplex*, para a identificação dos genes que codificam os fatores de virulência que caracterizam *E. coli* diarreiogênica: enteropatogênica (EPEC), enteroagregativa (EAEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), produtora de toxina shiga (STEC) e enterohemorrágica (EHEC). Verificou-se a desconformidade das contagens de *E. coli* de acordo com o padrão de 100 UFC/g preconizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária a partir do dia 20 e o crescimento microbiano menor que o esperado no dia 60. Em relação a caracterização molecular dos isolados, os genes *stx2* e *ipaH* predominaram durante as análises. No dia 20, foram identificados isolados com os genes que codificam fatores de virulência para a EPEC, ETEC, STEC e EIEC, no dia 40 para a EPEC e no dia 60 para a STEC e EIEC, evidenciando a importância da adoção de medidas sanitárias a fim de diminuir os riscos de infecção e intoxicação referentes a *E. coli* patogênica aos consumidores.

Palavras-Chave: Biologia Molecular, Contrafilé, Enterobactéria, Reação em Cadeia da Polimerase Multiplex.

ABSTRACT

Over the past decade, Brazil assured its position as the second-largest producer of bovine beef in the global market. In addition, according to the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply and Brazilian Agricultural Research Corporation projection, in the next ten years the beef consumption will increase by 10,4%. To accompany production growth, it is also necessary to increase its physical, chemical and microbiological quality. The enterobacteria *Escherichia coli* is suggestive of an indication of faecal contamination origin, regarding a meat indicator of inadequate processing during slaughter. It is important for public health once some strains are associated with cases of diarrhea in epidemiological studies. The objective of the present work was to determine the count and molecular characterization of diarrheagenic *E. coli* during the vacuum-packed sirloin (*Longissimus lumborum*) shelf-life. Five cutting parts were acquired in a slaughterhouse of federal inspection and analyzed on days 0, 20, 40 e 60 after vacuum-packed. Counting and identification of *E. coli* were performed using official methods. Multiplex PCR assays submitted isolates for gene identification that encodes virulence factors that characterize diarrheagenic *E. coli*: enteropathogenic (EPEC), enteroaggregative (EAEC), enterotoxigenic (ETEC), enteroinvasive (EIEC), Shiga toxin-producing (STEC) and enterohemorrhagic (EHEC). It was verified the incompatibility of *E. coli* counting in accordance with the Brazilian Health Regulatory Agency standard envisioned of 100 UFC/g from day 20 and microbial growth lower than expected on day 60. Regarding isolates molecular characterization, *stx2* and *ipaH* genes predominated during the analyses. On day 20, isolates were identified with genes that encode virulence factors for EPEC, ETEC, STEC and EIEC, on day 40 for EPEC and on day 60 for STEC and EIEC, highlighting the importance of sanitary measures adoption in order to reduce infection and intoxication cases related to pathogenic *E. coli* to consumers.

Keywords: Enterobacteria, Molecular Biology, Multiplex Polymerase Chain Reaction, Sirloin.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1 – Placas Compact Dry® EC devidamente identificadas conforme a diluição selecionada.....	24
Figura 2 – Placas Compact Dry® EC após 24 horas de incubação.....	24
Quadro 1 – Alvos genéticos, <i>primers</i> e produtos esperados de cada ensaio, conforme Aranda et al. (2004)	25
Figura 3 – Termocilador (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad, EUA).....	26
Figura 4 – Evolução da contagem, tendência linear e desvio padrão de <i>Escherichia coli</i> durante a vida útil de contrafilé bovino durante 60 dias de embalagem a vácuo....	28
Figura 5 – Resultado da PCR, ensaio 2, realizada no D-20.....	30
Figura 6 – Resultado da PCR, ensaio 1, realizada no D-20.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Contagem de Coliformes Totais e <i>E. coli</i> nas placas <i>Compact Dry</i> ® EC das amostras analisadas de contrafilé (<i>Longissimus lumborum</i>) embalados a vácuo a cada 20 dias.....	27
Tabela 2 – Identificação de genes que codificam os fatores de virulência característicos de EPEC, STEC, EHEC, EIEC, EAEC e ETEC, pela PCR, nos isolados sugestivos de <i>E. coli</i> no D-0, D-20, D-40 e D-60.....	29

LISTA DE SIGLAS

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

USDA – United States Department of Agriculture

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

FAO – Food and Agriculture Organization

RIISPOA - Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal

ABIEC – Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes

CWE – Peso de equivalente-carcaça

SIF – Serviço de Inspeção Federal

Stx – Toxina Shiga

Stx₁ – toxina Shiga 1

Stx₂ – toxina Shiga 2

EAEC – *E. coli* enteroagregativa

EIEC – *E. coli* enteroinvasiva

EPEC – *E. coli* enteropatogênica

ETEC – *E. coli* enterotoxigênica

STEC – *E. coli* produtora de toxina shiga

EHEC – *E. coli* enterohemorrágica

PCR – Reações em Cadeia da Polimerase

pb – Pares de bases

PSOs – Procedimentos Sanitários Operacionais

BHI – Brain Heart Infusion

BOD – Biochemical Oxygen Demand

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 PRODUÇÃO DE CARNE NO BRASIL	15
3.2 QUALIDADE DA CARNE	15
3.2.1 Físico-química	16
3.2.2 Microbiológica	17
3.3 CONTROLE DA QUALIDADE E VIDA ÚTIL DA CARNE	17
3.3.1 Micro-organismos indicadores da qualidade	17
3.3.1.1 Aeróbios mesófilos	18
3.3.1.2 Psicrotróficos	18
3.3.1.3 Estafilococos coagulase positiva	18
3.3.1.4 Enterobactérias	19
3.3.1.4.1 Coliformes Totais	19
3.3.1.4.2 Coliformes Termotolerantes	19
3.3.1.4.3 <i>Escherichia coli</i>	20
3.4 ESCHERICHIA COLI PATOGÊNICA	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
6 CONCLUSÃO	32
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1 INTRODUÇÃO

O Brasil assegura um posto de destaque internacional na bovinocultura de corte pelo maior rebanho do mundo, segundo maior produtor e principal exportador de carne bovina, em 2021, segundo a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (ABIEC, 2021).

Sob esse ponto de vista, é essencial que a qualidade da carne seja satisfatória, garantindo segurança alimentar e saúde aos consumidores ao mesmo tempo que satisfaça suas exigências, principalmente em relação ao aspecto sensorial.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) delimita, em sua Instrução Normativa nº60 de 2019 (BRASIL, 2019), padrões microbiológicos que a carne bovina deve atender, como as contagens de *Escherichia coli* e aeróbios mesófilos, além da análise qualitativa de *Salmonella* spp., com o objetivo de assegurar um produto com qualidade microbiológica a população e com controle e monitoramento de riscos.

A *E. coli* é um coliforme fecal Gram negativo e anaeróbio facultativo, causador de infecções alimentares (FRANCO; LANDGRAF, 2008) e importante micro-organismo indicador de qualidade em alimentos, devido a sua presença no trato gastrointestinal de humanos e animais, nos alimentos indicando a origem fecal da contaminação do produto e possível presença de outros enteropatógenos. Acrescenta-se ainda a existência de linhagens de *E. coli* que são patogênicas (GOMES et al., 2016).

Quantificar esse micro-organismo, no entanto, não indica o perigo para o consumo, uma vez que, na maioria das vezes, a *E. coli* é comensal e sem potencial de causar doenças. Algumas, no entanto, podem apresentar fatores de virulência que podem comprometer a segurança para o consumo da carne. Dessa forma, é fundamental caracterizar se os isolados dessa espécie possuem ou não o potencial patogênico.

Em razão disso, o objetivo geral do presente trabalho foi quantificar *E. coli* em peças de contrafilé embaladas à vácuo nos dias 0, 20, 40 e 60 de vida útil, assim como, utilizando ferramentas biomoleculares (Reações em Cadeia da Polimerase – PCR – *multiplex*), realizar a pesquisa de fatores de virulência para *E. coli* diarreio gênica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar a contagem e a caracterização molecular de *Escherichia coli* diarreiogênica durante a vida útil de contrafilé (*Longissimus lumborum*) embalado a vácuo.

2.2 Objetivos Específicos

- Quantificar *E. coli* em peças de contrafilé embaladas à vácuo nos dias 0, 20, 40 e 60 de vida útil;
- Isolar cepas de *E. coli* obtidas a partir das contagens microbiológicas;
- Realizar a extração de DNA dos isolados;
- Caracterizar, por abordagem molecular, a patogenicidade dos isolados pela identificação de genes que codificam os fatores de virulência; e,
- Determinar a evolução dos isolados de *E. coli* patogênica ao longo da vida útil da carne bovina embalada a vácuo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 PRODUÇÃO DE CARNE BOVINA NO BRASIL

O Brasil, em 2020, com 217 milhões de cabeças, de acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa, 2021), representa 14,3% da produção mundial, segundo o *Beef Report*, Perfil da Pecuária no Brasil 2021, da Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes (ABIEC, 2021). Conquistou o posto de maior rebanho do mundo e assegurou seu lugar como segundo maior produtor, atrás somente dos Estados Unidos com 17,4% e é o principal exportador de carne bovina no ranking mundial com 2.690,9 mil (ABIEC, 2021). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2021), o rebanho brasileiro de bovinos, em 2020, aumentou 1,5% em relação a 2019.

Em 2021, a produção mundial de carne bovina foi estimada em 61,5 milhões de toneladas, na qual o Brasil representa 16,8% do volume global produzido, atrás somente dos Estados Unidos com 20%, de acordo com projeções. Além disso, o Brasil alcançará o volume de 10,5 milhões de toneladas métricas de peso de equivalente-carcaça (MT/CWE), segundo o *United States Department of Agriculture* (USDA, 2020).

O total de bovinos abatidos no Brasil no primeiro e segundo trimestre de 2021 foi de 6.588 e 7.075 mil cabeças, respectivamente, havendo uma redução total de 7,3%, quando comparado a 2020 (IBGE, 2021). Essa diminuição pode estar relacionada com o aumento de preço de gado e bezerros, e da disponibilidade de bovinos para o abate, resultando na redução de consumidores do produto, devido ao acréscimo do preço do mesmo (USDA, 2021).

De acordo com o relatório *Livestock and Poultry: World and Trade* do USDA, em 2022, a produção mundial de carne bovina aumentará em 1% em função do crescimento da Austrália, Brasil e Índia (USDA, 2021). No Brasil, essa estimativa é fundamentada pela maior disponibilidade de animais, resultando em margens satisfatórias para os frigoríficos.

3.2 QUALIDADE DA CARNE

A qualidade da carne é um fator que possui grande influência sobre a decisão dos consumidores em adquiri-la ou não, procurando produtos que satisfaçam suas

respostas sensoriais e psicológicas, garantindo segurança alimentar, saúde e elevado valor nutritivo (FELÍCIO, 1997).

De acordo com o artigo 475 do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) (BRASIL, 2017), análises físicas, microbiológicas, físico-químicas, de biologia molecular, histológicas e outras indispensáveis devem ser realizadas nos estabelecimentos, de modo a controlar o processo produtivo e avaliar se a conformidade das matérias-primas e dos produtos de origem animal está de acordo com os limites definidos em legislação.

3.2.1 Físico-química

A palatabilidade e a composição da carne são fatores que definem e influenciam a qualidade sensorial da carne. A palatabilidade compreende a identificação visual, o aroma, a firmeza, a suculência, maciez e sabor. Em relação a identificação visual, ela engloba a cor, o marmoreio e a capacidade de retenção de água da carne (FAO, 2014).

A cor deve ser uniforme em todo o corte cárneo (FAO, 2014). Esse fator é influenciado pela exposição ao oxigênio, pela forma química e pela quantidade de mioglobina do músculo, pelo potencial hidrogeniônico (pH) e formação de carne escura, firme e seca (DFD) e de carne pálida, flácida e exsudativa (PSE) (FEIJÓ, 1999).

O pH é um fator essencial no processo da transformação do músculo em carne, podendo afetar a futura qualidade da carne indiretamente e diretamente (FEIJÓ et al., 1999). O pH elevado resultará na diminuição da vida de prateleira da carne, em função da contaminação e multiplicação de micro-organismos deteriorantes. Além disso, a variação do pH forma a carne DFD, devido o bloqueio da queda do pH pelo estresse prolongado ao qual o animal foi submetido (MAGNO, 2014), importante para controle microbiológico da taxa de multiplicação dos contaminantes.

O marmoreio está relacionado aos aspectos sensoriais da carne (MAGNO, 2014), como a suculência e o sabor da carne, em que a primeira depende da quantidade de água retida durante o cozimento e da quantidade de gordura na carne, acrescenta-se o fato de auxiliar a manter um aspecto mais suave a carne, enquanto o sabor em conjunto com o aroma da carne são os responsáveis pela sensação dos consumidores ao ingerirem a carne (FAO, 2014).

3.2.2 Microbiológica

De acordo com o artigo 497 do RIISPOA (BRASIL, 2017), as matérias-primas ou os produtos de origem animal são considerados impróprios para o consumo quando contenham micro-organismos patogênicos em níveis que ultrapassem os limites permitidos, em normas complementares e em legislação específica.

A Instrução Normativa nº60 de 2019 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2019), no seu anexo I, que estabelece os padrões microbiológicos de alimentos, declara que para carne bovina crua embalada a vácuo, o limite microbiológico de *Escherichia coli* por gramas de carne é 10^2 UFC/g, em um plano de três classes. De acordo com essa legislação, que regulamenta a qualidade do produto no comércio e, conseqüentemente, deve ser utilizada como parâmetro para determinação da vida útil (*shelf life*), de cada lote devem ser avaliadas 5 (n) amostras, das quais 2 (c) podem apresentar contagens de *E. coli* entre 10 (m) e 100 UFC/g (M). As demais 3 amostras (n – c) devem apresentar contagens de *E. coli* menores que 10 UFC/g.

Essa mesma legislação determina limites de aeróbios mesófilos e *Salmonella* spp. para atestar a qualidade microbiológica para o consumo (BRASIL, 2019).

3.3 CONTROLE DE QUALIDADE E VIDA ÚTIL DA CARNE

Heuvelink et al. (2001), declaram que a contaminação microbiológica da carne bovina é decorrente da contaminação da carcaça durante toda a cadeia produtiva de produção de carne, através do animal, de equipamentos e do ser humano. Dessa forma, boas práticas higiênicas são fundamentais para o decréscimo da contaminação da carne, do risco de infecção aos consumidores e para o aumento da vida útil do alimento.

3.3.1 Micro-organismos indicadores da qualidade

Os micro-organismos indicadores da qualidade são fundamentais para a avaliação microbiológica de alimentos, devido a facilidade e rapidez de detecção em relação à pesquisa direta de micro-organismos patogênicos. Através desses micro-

organismos é possível identificar se houve contaminação fecal, se patógenos estão presentes, qual o potencial de deterioração e se as condições sanitárias foram eficientes durante todas as etapas de produção do alimento (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Esses micro-organismos são pesquisados para avaliar predominantemente a segurança e a higiene dos alimentos (FORSYTHE, 2013).

3.3.1.1 Aeróbios mesófilos

Aeróbios mesófilos são considerados todos os micro-organismos capazes de se multiplicar em 48h de incubação à 35-37°C (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Esse grupo de micro-organismos representa, portanto, a contaminação total de um alimento. São sinônimos, contagem bacteriana total (CBT) e contagem padrão em placas (CPP). Incluem-se, mas não se limitam, a bactérias mesófilas estritas ou facultativas, leveduras e fungos filamentosos de crescimento rápido (PEREIRA et al., 2013).

3.3.1.2 Psicotróficos

Os micro-organismos psicotróficos são oriundos da água, solo e fezes, e compõe uma população de micro-organismos presentes na pele dos bovinos (ROÇA, 2004). A contagem de bactérias psicotróficas possibilita a identificação do grau de deterioração de alimentos refrigerados (FRANCO; LANDGRAF, 2008). O gênero *Pseudomonas*, principal psicotrófico, diminui a vida útil das carnes frescas, em concordância com a temperatura de refrigeração, devido a metabolização de aminoácidos que implica na geração de compostos de odores desagradáveis (VENTURINI, 2003).

Esses micro-organismos compõem a microbiota mesófila e, quando o alimento é refrigerado, passa por alterações estruturais e metabólicas que permitem a sua multiplicação mesmo sob refrigeração. Alteram seu metabolismo principalmente para as vias proteolíticas e lipolíticas, degradando os constituintes da carne, promovendo alterações sensoriais e, conseqüentemente, redução da sua vida útil (SANTANA et al., 2001, apud MARIOTO et al., 2020).

3.3.1.3 Estafilococos coagulase positiva

Estafilococos coagulase positiva são cocos Gram positivos, anaeróbios facultativos, no qual a maior parte multiplica-se em 7,5 a 15% de NaCl. O *Staphylococcus aureus*, principal espécie do grupo, contamina os alimentos através de ferimentos na pele e das vias aéreas do ser humano. Indicam em alimentos, portanto, qualidade higiênico-sanitária da manipulação. No alimento essa bactéria pode produzir enterotoxinas que, quando ingeridas pelo homem, podem causar intoxicação alimentar (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

3.3.1.4 Enterobactérias

As enterobactérias são consideradas bactérias Gram negativas anaeróbias facultativas que podem acelerar a deterioração dos alimentos (FRANCO; LANDGRAF, 2008). São de fácil detecção e envolvem gêneros fermentadores e não fermentadores de lactose (FORSYTHE, 2013).

3.3.1.4.1 Coliformes Totais

Esse grupo é composto por bactérias, Gram negativas e anaeróbias facultativas em forma de bastonetes, e, por serem destruídos quando em temperaturas elevadas, são importantes na avaliação de contaminação pós-processamento dos alimentos (FORSYTHE, 2013).

Os coliformes totais são indicadores de contaminação ambiental e da possível presença de enteropatógenos, uma vez que esse grupo é composto por bactérias que habitam o trato intestinal dos humanos, como a *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Shigella*, e também daquelas que permanecem durante grande parte de sua existência no solo e nos vegetais. Esse grupo produz gás, em virtude da fermentação da lactose, quando são incubados a 35-37°C por 48 horas (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

3.3.1.4.2 Coliformes Termotolerantes

Os coliformes termotolerantes é um subgrupo dos coliformes totais, dos quais quando submetidos a condições de temperatura entre 44-45,5°C, por 48 horas,

produzem gás, oriundo da lactose fermentada em meio EC. Como principal espécie desse grupo, a *E. coli* é a melhor indicadora de contaminação fecal e indicadora da possível presença de patógenos entéricos (FORSYTHE, 2013). Os principais gêneros que compõem esse grupo são: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella* (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

3.3.1.4.3 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é a principal espécie do gênero *Escherichia* da família *Enterobacteriaceae*, pertencendo ao grupo dos coliformes termotolerantes, os quais são importantes indicadores de contaminação fecal nos alimentos, em razão de sua presença no trato gastrointestinal do ser humano e dos animais, resultado de condições higiênico sanitárias inadequadas (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A *E. coli* é uma bactéria mesófila, para multiplicar-se a temperatura deve ser entre 35-37°C, além disso é inativada quando a temperatura está em 70°C e pela ação de grande parte dos desinfetantes. Para a sua detecção são necessários métodos microbiológicos específicos, e sua caracterização como patogênica é dependente de biologia molecular e/ou métodos imunológicos para detecção de antígenos somáticos e flagelares (TONDO, 2020).

Essa bactéria caracteriza-se por ser bacilo Gram-negativo, não formar esporos e ser capaz de fermentar lactose. Muitas linhagens da *E. coli* são patogênicas e podem originar reações indesejáveis nos alimentos (FRANCO; LANDGRAF, 2008), indicando, portanto, a origem da contaminação fecal nos alimentos; possível presença de outros enteropatógenos; e, risco à segurança do consumo de alimentos pela sua potencial patogênese.

3.4 *Escherichia coli* PATOGÊNICA

A *E. coli* permanece inofensiva no lúmen intestinal humano enquanto o mesmo está saudável, todavia causam infecção quando o hospedeiro encontra-se debilitado, com a imunidade baixa ou quando as barreiras gastrointestinais são invadidas. Os sintomas clínicos em decorrência da infecção são infecção no trato urinário, meningite e doenças entéricas (NATARO; KAPER, 1998).

De acordo com Nataro e Kaper (1998), cinco categorias de *E. coli* são associadas a estudos epidemiológicos: a *E. coli* enteropatogênica (EPEC), enteroagregativa (EAEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC) e produtora de toxina shiga (STEC). Essas categorias são caracterizadas por meio de fatores de virulência que são codificados geneticamente por DNAs cromossômicos, plasmídicos e bacteriófagos, e representados pelos genes *eae*, *ipaH*, LT e/ou ST, e *stx*₁ e/ou *stx*₂ (toxinas Shiga) (ARANDA et al., 2004).

A categoria EPEC causa gastroenterite em crianças e a diarreia resultante dessa bactéria é grave, seguida por dores abdominais, vômito e febre. Seu período de incubação dura em média 36 horas e sua virulência correlaciona-se a sua adesão ao enterócito (AL), através do fator de enteroadesão EAF originado do plasmídeo *eaf*, e a destruição das microvilosidades das células do epitélio intestinal, proveniente da lesão produzida pelo efeito “*attaching and effacing*”, produto do gene *eaeA* (FRANCO; LANDGRAF, 2008; GOMES et al., 2016; JERSE et al., 1990).

A EAEC não secreta enterotoxinas termolábeis ou termoestáveis e, em um padrão agregativo (AA), adere às células HEp-2 no cólon. Essa bactéria é responsável por causar diarreia aquosa incessante, principalmente em crianças, e também está relacionada ao baixo crescimento e baixo ganho de peso, quando isolados foram encontrados nas fezes de bebês. A preocupação principal com essa bactéria seria o ciclo vicioso entre a nutrição deficiente e a evolução da infecção provocada pela EAEC, no qual esses dois componentes são facilitadores da ocorrência um do outro (NATARO; STEINER; GUERRANT, 1998).

A bactéria que coloniza e adere a parte proximal da mucosa do intestino delgado, causando uma diarreia que lembra água de arroz, consequência da secreção de toxinas termolábeis (LT) e termoestáveis (ST), é a ETEC, conforme Forsythe (2013) e O'Brien e Holmes (1987). Enquanto a EIEC que coloniza o cólon é caracterizada por ser invasiva, multiplicando-se em conjunto com as células epiteliais, devido a proteína IPA, sintetizada pelo plasmídeo *inv*. A dose de infecção por essa categoria é de 10⁶ até 10⁸ células (FRANCO; LANDGRAF, 2008; O'BRIEN; HOLMES, 1987).

Os isolados da *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) são capazes de produzir a toxina shiga (Stx) (MELTON-CELSA, 2014) e podem provocar diarreia com sangue (RILEY et al., 1983). O'Brien e Holmes (1987) caracterizam EHEC quando o gene *eaeA* e algum dos genes que codificam a síntese da toxina shiga são detectados simultaneamente (ARANDA et al., 2004).

A toxina shiga (Stx) é sintetizada pela STEC e representa risco para diversas linhagens celulares (PATON; PATON, 1998). Segundo Paton e Paton (2002), Stx1 e Stx2 são os dois principais tipos de Stx e sua função é inibir a síntese proteica das células alvos, por meio da remoção do resíduo adenina do rRNA 28S do ribossomo 60S (MELTON-CELSA, 2014).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas cinco amostras do corte cárneo bovino contrafilé (*Longissimus lumborum*) embalados a vácuo na embalagem do estabelecimento, de aproximadamente 1 kg cada e de animais diferentes. Cada peça foi alíquotada em quatro cortes de aproximadamente 250 gramas. Uma alíquota de cada peça foi unida em *pool* à uma única embalagem a vácuo do próprio estabelecimento, obtendo-se, portanto, quatro embalagens contendo cinco porções de 250g representativas de cinco peças. As amostras foram obtidas na sala de desossa de um abatedouro frigorífico de bovinos com registro no Serviço de Inspeção Federal (SIF), no município de Araguaína, Tocantins, em 25 de setembro de 2021.

As amostras foram transportadas sob refrigeração até o Laboratório de Microbiologia de Alimentos (LabMA) da Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT). Ao chegarem no laboratório, as amostras tiveram sua temperatura medida e a manutenção da conservação das amostras sob refrigeração ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) foi realizada de acordo com as especificações definidas na rotulagem do fabricante em cabine BOD (Biochemical Oxygen Demand).

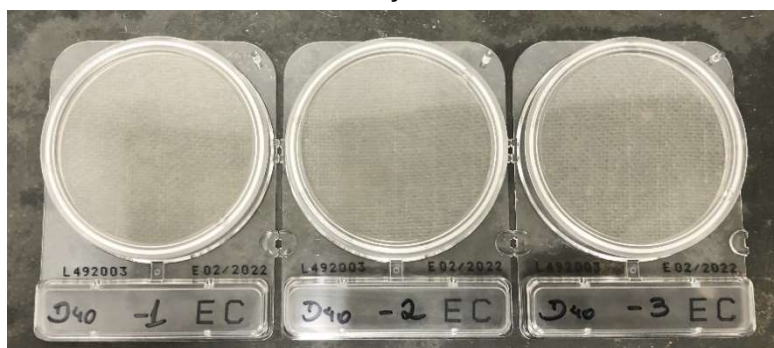
As amostras foram analisadas por 60 dias, sucessivamente, uma de cada *pool*, com o intervalo de 20 dias, descritas como D-0, D-20, D-40, D-60.

Para o preparo das amostras, primeiramente, a embalagem do *pool* foi higienizada externamente com álcool líquido 70% e, em seguida, removida com o auxílio de uma pinça e tesoura, previamente higienizadas com álcool 92% e flambadas. Pesou-se 25 g da amostra em placas estéreis de forma asséptica, com cautela para representar todas as peças e todas as partes que constituem os *pools*. Após isso, adicionou-se 25 g da amostra e 225 mL de Água Peptonada Tamponada (BPW), proporção de 1:10, dentro de uma bolsa estéril, de forma asséptica, que seguiu para o homogeneizador de amostras tipo “*Stomacher*” por 180 segundos.

A diluição decimal seriada foi realizada, portanto, transferindo-se asepticamente 1mL dessa diluição, utilizando uma pipeta de 1 mL, para 9 mL de solução salina peptonada, formando a diluição de 10^{-2} . Nas diluições subsequentes, até 10^{-6} , realizou-se a mesma técnica, contudo, o tubo foi agitado com o auxílio de um agitador tipo “vortex” por 15 segundos, para homogeneizar, antes de transferir 1 mL do seu volume para 9 mL do diluente seguinte.

Para a contagem de coliformes totais e *E. coli* foram utilizadas placas de *Compact Dry*[®] EC (Cap-Lab, Brasil), previamente identificadas de acordo com as três diluições selecionadas da amostra. Inoculou-se 1 mL de cada amostra na placa correspondente, a ponta da pipeta foi posicionada perpendicularmente ao centro da placa. Em seguida, a amostra espalhou-se igualmente pela placa inteira, tornando o meio desidratado em gel. Por último, fechou-se a placa e incubou-a a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ / 24 ± 2 h conforme as recomendações do fabricante e representado nas Figuras 1 e 2.

Figura 1 – Placas *Compact Dry*[®] EC devidamente identificadas conforme a diluição selecionada.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 2 – Placas *Compact Dry*[®] EC após 24 horas de incubação.



Fonte: Arquivo pessoal.

Após o período de 24 horas de incubação à 35°C , procedeu-se a leitura de coliformes totais e *E. coli*. Os isolados sugestivos de *E. coli* presentes no meio da placa *Compact Dry*[®] (colônias azuis) foram recuperados no caldo cérebro coração (BHI), um meio de cultivo líquido, por 24 horas a 35°C e submetidos a extração do DNA (RIBEIRO JÚNIOR et al., 2016).

Distribuiu-se uma alíquota de 1 ml de cada tubo de BHI em um microtubo correspondente de forma asséptica. Os tubos foram centrifugados durante 3 minutos, à 15.000 rpm. Após isso, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 200 μL do Tampão TE (Tris-HCl [10 mM]: EDTA [1 mM]), que seguiu para o agitador tipo “vortex”, para homogeneizar a amostra (RIBEIRO JÚNIOR et al., 2016).

Os tubos foram submetidos à fervura e ao banho de gelo, por 15 minutos cada, e seguiram para a centrifuga por mais 3 minutos. Posteriormente, 50 μL do sobrenadante foi alíquotado para um novo microtubo, armazenado à -20°C , que foi encaminhado para a PCR.

As Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) *multiplex* foram realizadas com mix composto por Água Pura (H₂O), tampão, desoxinucleotídio trifosfato (dNTP), Cloreto de Magnésio (MgCl₂), *primers forward*, *primers reverse* e a enzima taq DNA polimerase. O volume final da reação foi de 25 µL, em que 1 µL corresponde a amostra e 24 µL ao mix, conforme Ribeiro Júnior et al. (2016).

Nesses isolados foram pesquisados os fatores de virulência *eaeA* e CVD432, gene LT e gene ST, *ipaH*, *stx1* e *stx2*, conforme Aranda et al. (2004), apresentados no Quadro 1, para caracterização de *E. coli* enteropatogênica (EPEC), enteroagregativa (EAEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC) e produtora de toxina shiga (STEC). A *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) foi caracterizada pela positividade simultânea aos genes que codificam STEC e EPEC.

A pesquisa dos genes *eaeA* e do alvo CVD432 foi realizada em ensaio *multiplex* com dois pares de *primers* (ensaio 1), enquanto os genes LT, ST, *stx1*, *stx2* e *ipaH* foram pesquisados também em ensaio *multiplex* (ensaio 2), contudo com cinco pares de *primers*, conforme o Quadro 1.

Quadro 1 – Alvos genéticos, *primers* e produtos esperados de cada ensaio, conforme Aranda et al. (2004).

Designação do primer	<i>Primers</i> (5' a 3') (referência)"	Gene alvo	Tamanho do <i>amplicon</i> (pb)
<i>eae1</i>	CTGAACGGCGATTACGCGAA	<i>eaeA</i>	917
<i>eae2</i>	CCAGACGATACGATCCAG		
EAEC1	CTGGCGAAAGACTGTATCAT	CVD432	630
EAEC2	CAATGTATAGAAATCCGCTGTT		
LTf	GGCGACAGATTATACCGTGC	gene LT	450
LTr	CGGTCTCTATATTCCCTGTT		
STf	ATTTTTMTTCTGTATTRTCTT	gene ST	190
STr	CACCCGGTACARGCAGGATT		
<i>ipaH1</i>	GTTCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC	<i>ipaH</i>	600
<i>ipaH2</i>	GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC		
Stx1f	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	<i>stx1</i>	180
Stx1r	AGAACGCCCACTGAGATCATC		
Stx2f	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	<i>stx2</i>	255
Stx2r	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG		

^a M, A/C; R, A/G.

Otimizou-se as condições de amplificação em gradiente em um termociclador (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad, EUA), representado na Figura 3, para os dois ensaios *multiplex*. As condições de temperatura/tempo determinadas para o ensaio 1 foram um ciclo de 95°C/5 min; 40 ciclos de 95°C/40 seg, 56°C/1 min, 72°C/2 min; finalizando com um ciclo de extensão a 72°C/7 min. Para o ensaio 2, as condições de temperatura/tempo definidas foram um ciclo de 95°C/5 min; 40 ciclos de 95°C/45 seg, 50°C/1 min, 72°C/1 min; finalizando com um ciclo de extensão a 72°C/7 min.

Figura 3 – Termociclador (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad, EUA).



Fonte: Arquivo pessoal.

Os produtos obtidos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% a 90 volts por 50 minutos, posteriormente corados em brometo de etídio (20 mg/mL) e, finalmente, documentados sob luz ultravioleta.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão apresentadas as contagens de coliformes totais e *E. coli*, em que a diluição adequada para a realização da leitura foi aumentando à medida que o intervalo entre a coleta e a análise das amostras crescia. Isso pode estar relacionado ao fato de que ao decorrer do tempo as condições do ambiente propiciaram a multiplicação das bactérias, em função da umidade preservada pela embalagem a vácuo, apesar das amostras serem conservadas sob refrigeração (RIBEIRO JÚNIOR et al., 2021).

Tabela 1 – Contagem de Coliformes Totais e *E. coli* nas placas *Compact Dry*® EC das amostras analisadas de contrafilé (*Longissimus lumborum*) embalados a vácuo a cada 20 dias

Dia da análise	Coliformes a 30°C (UFC/g)	<i>Escherichia coli</i> (UFC/g)
0	2x10 ¹	1x10 ¹
20	172x10 ²	7x10 ²
40	519x10 ⁴	25x10 ⁴
60	38x10 ⁵	3x10 ⁴

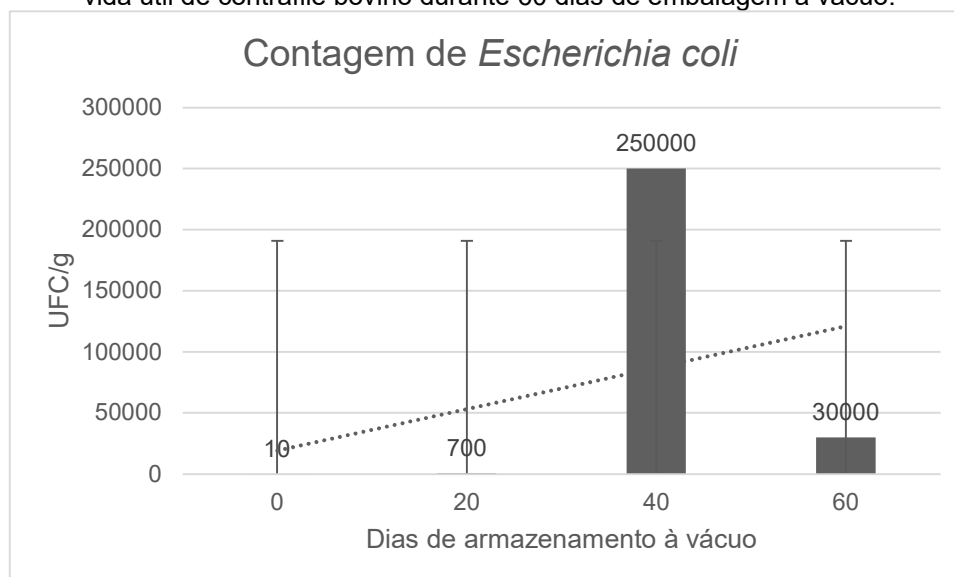
Fonte: Próprio autor

A presença de coliformes totais e *E. coli* pode ser consequência do abate e processamento executados inadequadamente e/ou com condições sanitárias ambientais que podem favorecer ou manter os micro-organismos indicadores de contaminação (ADZITEY, 2020). O autor Adzitey (2015) em seu estudo verificou que locais com as práticas de higiene comprometidas apresentaram maior ocorrência de *E. coli* em seus cortes bovinos, quando comparado a um local que é comprometido com a higiene do seu estabelecimento e produto.

Sabidamente, a contaminação de carcaças de bovinos por coliformes e *E. coli* decorre do contato intrínseco da carcaça com o couro ou contaminantes do próprio animal de origem entérica (JARDIM et al., 2006). Dessa forma, são realizados procedimentos sanitários operacionais (PSOs) durante todo o processo para minimizar a ocorrência desses contaminantes na carcaça que podem se manter viáveis durante toda a vida útil do produto (COSTA, 2018). Inclusive, aumentando a sua população durante a *shelf life* da carne já embalada à vácuo, conforme pode ser observado na Figura 4.

Considerando que mesmo práticas sanitárias sendo executadas de forma correta nas indústrias, o próprio MAPA tolera a ocorrência de *Enterobacteriaceae* em carcaças de bovinos de 100 (2 log) a 1000 (3 log) UFC/cm² (BRASIL, 2018).

Figura 4 – Evolução da contagem, tendência linear e desvio padrão de *Escherichia coli* durante a vida útil de contrafilé bovino durante 60 dias de embalagem a vácuo.



Fonte: Próprio autor

Conforme observado na Tabela 1 e Figura 4, a contagem de *E. coli* no D-40 reduziu no D-60 em 88 %. Durante a análise microbiológica, no D-60, também foram observadas alterações sensoriais como alteração do aspecto, textura e aroma da carne. Dessa forma, foi possível inferir que houve grande multiplicação de micro-organismos deteriorantes. Essa alta população de micro-organismos (principalmente psicrótróficos com metabolismo deteriorante) e o antagonismo antimicrobiano (bacteriocinas, ácidos e peróxidos), além do inevitável erro analítico, podem ter influenciado na redução da população de isolados viáveis de *E. coli* no D-60, assim como o fim da fase estacionária de multiplicação e possível declínio.

Através das contagens, também foi possível determinar que a partir do D-20 as amostras apresentavam-se em desacordo com o padrão de 100 UFC/g determinado pela ANVISA (BRASIL, 2019). Dessa forma, para atendimento do padrão e aumento da *shelf life* dos produtos cárneos, os PSOs precisam ser revistos e outras medidas como a desinfecção ambiental, higiene dos manipuladores e práticas que evitem a contaminação das carcaças durante o abate dos animais precisam ser melhor executadas para atendimento dos padrões do Ministério da Saúde.

Quanto a caracterização da patogenicidade dos isolados sugestivos de *E. coli*, apresentada na Tabela 2 e representada nas Figuras 5 e 6, no dia 0, não foi identificado nenhum fator de virulência no isolado sugestivo. Todavia, na análise do dia 20, entre os sete isolados, um (14,28%) continha o gene *eaeA*, dois o gene *ST* (28,57%), dois o gene *stx2* (28,57%) e um o gene *ipaH* (14,28%), característicos de EPEC, ETEC, STEC e EIEC, respectivamente.

Dos 25 isolados sugestivos no dia 40, somente em um foi encontrado o gene *eaeA* (4%), característico de EPEC (Tabela 2). Em relação ao dia 60, nos 3 isolados, verificou-se em um o gene *stx2* (33,3%), particularidade da STEC, e o gene *ipaH* (33,3%), representante da EIEC. Os genes codificadores de fatores de virulência CVD432, LT, *stx1* e *eaeA* + *stx1* ou 2, de EAEC, ETEC, STEC e EHEC, respectivamente, não foram identificados durante as análises.

Tabela 2 – Identificação de genes que codificam os fatores de virulência característicos de EPEC, STEC, EHEC, EIEC, EAEC e ETEC, pela PCR, nos isolados sugestivos de *E. coli* no D-0, D-20, D-40 e D-60

<i>E. coli</i> diarreio gênica	Gene	Dias de <i>shelf life</i> (número)			
		0 (1)	20 (7)	40 (25)	60 (3)
EPEC	<i>eaeA</i>	0	1	1	0
STEC	<i>stx1</i>	0	0	0	0
	<i>stx2</i>	0	2	0	1
EHEC	<i>eaeA</i> + <i>stx 1</i> e/ou 2	0	0	0	0
EIEC	<i>ipaH</i>	0	1	0	1
EAEC	<i>CVD432</i>	0	0	0	0
ETEC	<i>ST</i>	0	2	0	0
	<i>LT</i>	0	0	0	0

Fonte: Próprio autor

Os genes *stx2* e *ipaH* foram os prevalentes nas análises desempenhadas ao longo da vida útil da carne bovina embalada a vácuo. Segundo a Instrução Normativa nº60 de 2018 do MAPA, quando um lote de carne de bovino apresenta resultado positivo para STEC, o abatedouro frigorífico, visando a eliminação e controle desse patógeno, deve encaminhar o lote para um tratamento pelo calor e comprovar ao SIF essas ações.

A carne bovina é um reservatório natural relevante da *E. coli* patogênica, portanto (GONZALEZ et al., 2016), apesar de somente um isolado, do total de 25 sugestivos, ser confirmado pela abordagem molecular no dia 40, ainda representa um risco microbiológico para os consumidores.

Na Figura 5, estão apresentados os resultados do ensaio 2 da PCR do D-20, em que os isolados 19 e 21 apresentarem amplificação de 255 pares de base (pb), positivos para o gene *stx2*, os 23 e 24 foram amplificados em 190 pb, positivos para o gene ST e o 21 também apresentou o gene *ipaH* (600 pb), o P representa o peso molecular e os controles positivos do gene *stx1* e *stx2* estão representados pelos números 35 e 36, respectivamente. Na leitura do ensaio 1 da PCR do D-20 (Figura 6), o isolado 2 foi positivo para o gene *eaeA* (917 pb), e o controle positivo para esse gene é identificado pelo número 5 e 6.

No D-40, apenas o isolado 18 apresentou resultado positivo na PCR para o gene *eaeA* (917 pb). Em relação ao D-60, verificou-se a amplificação de 255 pb e 600 pb do isolado 2, positivos para o gene *stx2* e *ipaH*.

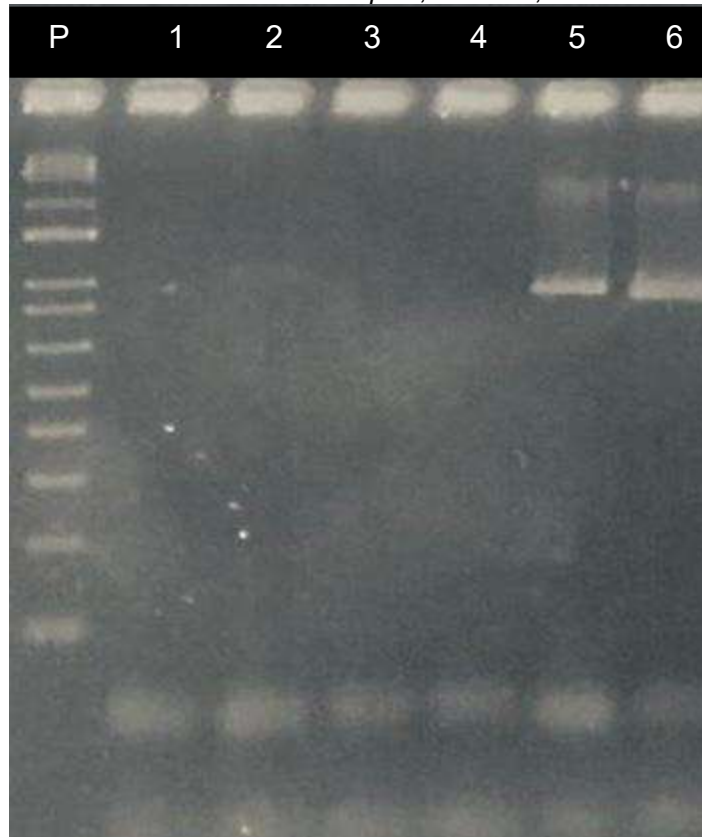
Figura 5 – Resultado da PCR *multiplex*, ensaio 2, realizada no D-20.



Legenda: Resultado de reação de PCR *multiplex* para os genes LT, ST, *stx1*, *stx2* e *ipaH*, em que os poços de 18 a 34 representam as amostras, P é o marcador de peso molecular e os poços 35 e 36 representam o controle positivo do gene *stx1* (180 pb) e do gene *stx2* (255 pb), respectivamente.

Fonte: Próprio autor

Figura 6 – Resultado da PCR *multiplex*, ensaio 1, realizada no D-20.



Legenda: Resultado de reação de PCR *multiplex* para os genes *eaeA* e do alvo CVD432, em que os poços de 1 a 4 representam as amostras, os poços 5 e 6 o controle positivo para o gene *eaeA* (917 pb) e P é o marcador de peso molecular.

Fonte: Próprio autor

6 CONCLUSÃO

O aumento da incidência de isolados sugestivos de *E. coli* durante a leitura da contagem de coliformes totais e *E. coli* realizada sucessivamente de 20 em 20 dias, pode estar relacionado a disponibilidade de condições propícias a multiplicação bacteriana. Todavia, o crescimento microbiano encontrado durante as análises do dia 60 não foi o esperado, mesmo estando dentro do desvio padrão, e uma possível justificativa seria o declínio da curva de crescimento microbiano, posterior a fase estacionária da mesma.

A caracterização molecular de cepas isoladas de *Escherichia coli* diarreiogênica durante a vida útil de contrafilé (*Longissimus lumborum*) embalado a vácuo, reflete na seriedade com que as medidas sanitárias devem ser levadas em consideração, do abate até os estabelecimentos comerciais, com o intuito de reduzir os riscos de infecção e intoxicação para os consumidores, em função dos fatores de virulência que caracterizam a *E. coli* patogênica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. Beef Report: Perfil da Pecuária no Brasil, 2021.

ADZITEY, Frederick. Incidence and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from beef (meat muscle, liver and kidney) samples in Wa Abattoir, Ghana. **Cogent Food & Agriculture**, v. 6, n. 1, p. 1718269, 2020.

ADZITEY, Frederick. Prevalence of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in beef samples sold at Tamale Metropolis, Ghana. 2015.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2019). Instrução normativa nº 60, de 23/12/2019. Padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União, 249, 133.

ARANDA, Katia Regina Silva; FAGUNDES-NETO, Ulysses; SCALETSKY, Isabel Cristina Affonso. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5849-5853, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – R.I.I.S.P.O.A. Artigo 475 do Decreto nº 9.013 de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – R.I.I.S.P.O.A. Artigo 497 do Decreto nº 9.013 de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2017.

COSTA, Vanessa Fernandes. Avaliação dos procedimentos sanitários operacionais (PSO) de bovinos no segundo semestre de 2017 em um frigorífico do município de Formiga-MG. 2018.

DE FELÍCIO, Pedro Eduardo. Fatores ante e post mortem que influenciam na qualidade da carne bovina. **Produção de novilho de corte**, v. 1, p. 79-97, 1997.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Brasil é o quarto maior produtor de grãos e o maior exportador de carne bovina do mundo, diz estudo. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/62619259/brazil-is-the-worlds-fourth-largest-grain-producer-and-top-beef-exporter-study-shows>>. Acesso em: 21 de novembro de 2021.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations for a world without hunger. Meat Quality, 2014. Disponível em:

https://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/meat/quality_meat.html. Acesso em: 21 de novembro de 2021.

FAO. Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura. Pesca e Aquicultura.

FEIJÓ, G. P. I. Curso “Conhecendo a carne que você consome”. **Qualidade da carne bovina. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte**, 1999. 25p. (Embrapa Gado de Corte. Documentos, 77).

FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2013.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. Editora Atheneu, São Paulo. 2008.

GOMES, Tânia AT et al. Diarrheogenic escherichia coli. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 3-30, 2016.

GONZALEZ AG, CERQUEIRA AM, GUTH BEC, et al. Serotypes, virulence markers and cell invasion ability of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) strains isolated from healthy dairy cattle. **J Appl Microbiol**. 2016;121:1130–1143.

HEUVELINK, Annet E. et al. Zero-tolerance for faecal contamination of carcasses as a tool in the control of O157 VTEC infections. **International journal of food microbiology**, v. 66, n. 1-2, p. 13-20, 2001.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária – Pesquisa Trimestral do Abate de Animais, 2021.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. PPM – Pesquisa da Pecuária Municipal. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?edicao=29151&t=destaques>. Acesso em: 21 de novembro de 2021.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rebanho bovino cresce 1,5% e atinge 218,2 milhões de cabeças em 2020. Disponível em: <https://censos.ibge.gov.br/2012-agencia-de-noticias/noticias/31725-rebanho-bovino-cresce-1-5-e-atinge-218-2-milhoes-de-cabecas-em-2020.html>. Acesso em: 21 de novembro de 2021.

JARDIM, F. B. B.; SILVA, E. N.; OKURA, M. H.; RAMOS, M. A. Influência dos sistemas de pastagem e confinamento na contaminação microbiana de carcaças bovinas. **Ciência Tecnologia de Alimentos, Campinas**, v. 26, n. 2, p. 277-282, 2006.

JERSE, Ann E. et al. A genetic locus of enteropathogenic Escherichia coli necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture

cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 20, p. 7839-7843, 1990.

MAGNO, Leonardo Lopes. **Fatores de influência na qualidade de carne ovina**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Zootecnia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

MARIOTO, Louise Rodrigues Mariano et al. Potencial deteriorante da microbiota mesófila, psicrotrofica, termodúrica e esporulada do leite cru. **Ciência Animal Brasileira**, v. 21, 2020.

MELTON-CELSA, Angela R. Shiga toxin (Stx) classification, structure, and function. **Microbiology spectrum**, v. 2, n. 4, p. 2.4. 06, 2014.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2018b). Instrução Normativa nº60 de 20 de dezembro de 2018. Estabelece o controle microbiológico em carcaça de suínos e em carcaça e carne de bovinos em abatedouros frigoríficos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, 246(1), 4.

NATARO, James P.; KAPER, James B. Diarrheagenic escherichia coli. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

NATARO, James P.; STEINER, Theodore; GUERRANT, Richard L. Enteroaggregative Escherichia coli. **Emerging infectious diseases**, v. 4, n. 2, p. 251, 1998.

O'BRIEN, Alison D.; HOLMES, Randall K. Shiga and Shiga-like toxins. **Microbiological reviews**, v. 51, n. 2, p. 206-220, 1987.

PATON, Adrienne W.; PATON, James C. Direct detection and characterization of Shiga toxigenic Escherichia coli by multiplex PCR for stx 1, stx 2, eae, ehxA, and saa. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 271-274, 2002.

PATON, James C.; PATON, Adrienne W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing Escherichia coli infections. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 3, p. 450-479, 1998.

PEREIRA, Juliana Ramos et al. Microbiota mesófila aeróbia contaminante do leite UHT. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 394, p. 25-31, 2013.

RIBEIRO JÚNIOR, Jose Carlos et al. Efficiency of boiling and four other methods for genomic DNA extraction of deteriorating spore-forming bacteria from milk. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 3069-3078, 2016.

RIBEIRO JÚNIOR, José Carlos et al. Influence of dry and wet beef maturation on the microbiological quality and safety. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 42, n. 1, p. 155-166, 2021.

RIBEIRO JÚNIOR, José Carlos et al. Qualidade e Segurança Microbiológica de Longissimus Dorsi In Natura e evolução das contagens de aeróbios mesófilos e psicotróficos de ao longo de 30 dias de maturação a seco (Dry-Aged). **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 4, p. 39347-39361, 2021.

RILEY, Lee W. et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare Escherichia coli serotype. **New England journal of medicine**, v. 308, n. 12, p. 681-685, 1983.

ROÇA, Roberto de Oliveira. Microbiologia da Carne. **Unesp, Campus de Botucatu**, 2004.

TONDO, Eduardo Cesar. **Perigos nos alimentos**. Editora Senac São Paulo, 2020.

USDA, FAS. Livestock and Poultry: World Markets and Trade. **United States Department of Agriculture**. Foreign Agriculture Service, 2020.

USDA, FAS. Livestock and Poultry: World Markets and Trade. **United States Department of Agriculture**. Foreign Agriculture Service, 2021.

USDA, FAS. Livestock and Products Annual. **United States Department of Agriculture**. Foreign Agriculture Service, 2021.

VENTURINI, Anna Cecilia. **Embalagens de transporte (Masterpack) com atmosfera modificada e absorvedores de oxigênio para aumento da vida útil de carne bovina**. 2003. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.